

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Freien Universität Berlin
im Klinikum Steglitz
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Dulce

ZUR BEDEUTUNG DER GLUCOSE FÜR
ENERGIESTOFFWECHSEL UND NUCLEOTIDBILDUNG
IN EHRLICH-ASCITESTUMORZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Alken

aus Berlin

1971

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Freien Universität Berlin
im Klinikum Steglitz

Direktor: Professor Dr. med. H. J. Dulce

Zur Bedeutung der Glucose für Energiestoffwechsel
und Nucleotidbildung in EHRLICH-Ascitestumorzellen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Alken
aus Berlin

Referent: Professor Dr. rer. nat. E. Liss

Korreferent: Professor Dr. med. H. Herken



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7. 10. 1971

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A Einleitung	1
B Materialien und Methoden.	3
1) Materialien	3
2) Incubationen	3
3) Aufschlußverfahren	5
4) Bestimmungsmethoden	5
C Ergebnisse	9
1) ATP- und Gesamtnucleotidgehalte sowie Milchsäurebildung	9
2) Zwischenprodukte des EMBDEN-MEYERHOF-Weges	18
3) 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphatgehalte	21
D Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	25
E Diskussion	27
F Zusammenfassung	39
G Literaturverzeichnis	40
H Anhang	I

A Einleitung

Der Stoffwechsel der meisten Tumorzellen zeichnet sich nach den ersten von WARBURG durchgeführten Untersuchungen durch eine außerordentlich hohe anaerobe Glycolyse und das Auftreten einer aeroben Glycolyse aus (1, 2).

Während die anaerobe Glycolyse das Wachstum der Tumorzellen unter Sauerstoffmangelbedingungen gewährleistet, sollte nach WARBURG die aerobe Glycolyse ein Ausdruck der geschädigten Zellatmung sein (3, 4).

In verschiedenen Arbeiten wurden seitdem Befunde wiedergegeben, nach denen bei nicht stattfindender Glycolyse Mangelerscheinungen in Tumorzellen auftreten (5, 6, 7, 8).

So kamen z. B. KUNZ und SCHMID durch ihre Versuche zu dem Ergebnis, daß durch die Atmung allein der ATP-Gehalt der Tumorzellen nicht aufrechterhalten werden kann, sondern kontinuierlich bis zum Tode der Zelle absinkt. Ursache dafür soll die mangelhafte energetische Wirksamkeit der Zellatmung sein (6).

In anderen Arbeiten ist dagegen darauf hingewiesen worden, daß die Atmung der Tumorzellen voll intakt ist und daß das Auftreten der aeroben Glycolyse nicht als Folge eines Defektes der Oxydation aufgefaßt werden darf (9, 10, 11, 12, 13, 14).

RUECKERT und MUELLER konnten zeigen, daß sich HeLa-Zellen bei Anwesenheit von Galactose im Nährmedium ebenso gut wie bei Glucoseanwesenheit vermehrten, obwohl dabei keine nachweisbare Glycolyse stattfand (11).

In einigen Arbeiten, so z.B. bei HENDERSON und LE PAGE (15) ist auch zu wenig beachtet worden, daß Glucose nicht nur als Energielieferant, sondern auch als Bausteinlieferant wirken kann.

In der hier vorliegenden Arbeit sollen diese Zusammenhänge in Bezug auf die Nucleotid- und ATP-Synthese untersucht werden.

Ehrlich-Ascitestumorzellen wurden in vitro mit Substraten des Energiestoffwechsels incubiert. Anschließend wurden die folgenden stationären Konzentrationen in den Zellen bestimmt:

1. Gesamtnucleotide und Adenosintriphosphat (ATP)
2. Glucose-6-phosphat (G-6-P)
Fructose-1,6-diphosphat (FDP)
Summe von Dihydroxyacetonphosphat (DAP) und
Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP)
3. 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP)

Außerdem wurden Milchsäurebildung bzw. -verbrauch der Zellen gemessen.

B Materialien und Methoden

1) Materialien

Die Fermente für die Bestimmung von ATP, Milchsäure, FDP, G-6-P, DAP und GAP wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen.

PRPP wurde von der Firma CalBiochem, Schweiz, bezogen.

Die übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Die Versuche wurden an Ehrlich-Ascitestumorzellen durchgeführt, die durch intraperitoneale Transplantation auf weiblichen CF1-Mäusen gehalten wurden.

2) Incubationen

5 bis 11 Tage nach der Transplantation wurden die Zellen mit einer heparinisierten Spritze entnommen und sofort nach der Entnahme - ohne Waschung - in ein eisgekühltes Medium von 90 Teilen Ringer-Lösung, 25 Teilen isotonischem Tris-Puffer (pH 7,4 bei 37°C) und 5 Teilen isotonischem Phosphatpuffer (pH 7,4 bei 37°C) gegeben.

Das Feuchtgewicht der Zellen wurde im Hämatokritröhrchen bestimmt, wobei 1 microlit. Zellen = 1 mg Zellen gesetzt wurde. Durch Verdünnung mit der oben angegebenen Lösung wurde für die Incubation eine 1%ige Zellsuspension hergestellt.

Die Versuche wurden - wenn nicht anders erwähnt - mit 50 mg Zellen / 5 ml Incubationslösung in 35 ml fassenden Incubationsgefäßen durchgeführt.

Die Incubationsgefäße wurden zunächst mit den Substraten beschickt und nach Zugabe der Zellsuspension zur Null-Zeit verschlossen in den Incubationsthermostaten bei 37°C gesetzt.

Bei den meisten Incubationen wurde eine Standardgruppe von Ansätzen untersucht:

1. Ansatz ohne jeden Zusatz, Incubationsdauer: 5 min. = Ausgangswert.
2. Ansatz ohne Zusatz über die ganze Incubationsperiode = Verarmungswert.
3. Ansatz mit Glucoseüberschuß.
4. Ansatz mit kleinen über die gesamte Incubationsperiode gleichmäßig verteilten Gaben kleiner Glucosemengen (im Text als "delta Glucose" bezeichnet).
5. Ansatz mit Galactoseüberschuß.

Die Ansätze wurden teilweise mit und ohne Glutaminzusatz incubiert.

Die Incubation wurde durch Abkühlen der Zellsuspension im Eisbad beendet.

3) Aufschlußverfahren

Nachdem die Incubation beendet war, wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert.

Im Überstand wurde gegebenenfalls die Milchsäure bestimmt.

Die Aufschlußverfahren für die Zellen waren bei den verschiedenen Analysen unterschiedlich.

Zur ATP- und Gesamtnucleotidbestimmung erfolgte der Aufschluß der Zellen mit kalter 0,5 n Perchlorsäure.

Zur Bestimmung von G-6-P, FDP, DAP und GAP wurden die Zellen mit kalter 5%iger Trichloressigsäure aufgeschlossen.

Zur PRPP-Bestimmung wurde der gesamte Ansatz in Zentrifugenröhrchen überführt, die in kochendem Wasser standen. Nach 30 sec. wurde im Eisbad abgekühlt. Nach Abzentrifugieren des unlöslichen Rückstandes wurde das PRPP im klaren Überstand bestimmt.

4) Bestimmungsmethoden

Genaue Einzelheiten sind aus den Belegprotokollen im Anhang zu entnehmen.

Milchsäure

Die Milchsäure wurde in einem Teil des Überstandes im optischen Test durch Reaktion mit Lactatdehydrogenase (LDH) und Nicotinamadenindinucleotid (NAD) durch die Extinktionsänderung bei 334 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt (16).

Gesamtnucleotide

Die Bestimmung erfolgte im Perchloratüberstand durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm. Zur Kontrolle der Reinheit wurde gleichzeitig die Absorption bei 240 nm gemessen, die ca. 50 - 65 % der Absorption bei 260 nm betrug, wenn keine störenden Verunreinigungen vorlagen.

ATP

Nach Neutralisieren eines Teiles des Perchloratextraktes mit KHCO_3 -Kristallen und Abtrennung der KClO_4 -Kristalle wurde ATP durch enzymatische Reaktion mittels Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) und NADH über die Extinktionsänderung bei 334 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt (16).

G-6-P, FDP, Summe von DAP und GAP

Aus dem Trichloressigsäureextrakt wurde die Säure durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther entfernt. In einem Teil des Extraktes wurde dann im gekoppelten enzymatischen Test - mittels Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (GDH), Triosephosphat-Isomerase (TIM), Aldolase und NADH - FDP und die Summe von

DAP und GAP im gleichen Ansatz bestimmt. Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 366 nm im Eppendorf-Photometer.

In einem anderen Teil des Extraktes wurde G-6-P ebenfalls enzymatisch mittels Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) und Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP) durch Extinktionsänderung bei 366 nm bestimmt (16).

PRPP

Die Bestimmung des PRPP erfolgte nach der von HENDERSON und KHOO angegebenen Methode (17) in der folgenden Ausführung:

PRPP aus dem Hitzeextrakt der Zellen reagiert mit im Überschuß zugegebenem radioaktiv markierten Adenin in der Anwesenheit von Adenosinmonophosphat-Pyrophosphorylase zu Adenosinmonophosphat (AMP), das isoliert wird und dessen Radioaktivität anschließend durch Liquidszintillationsmessung bestimmt wird. Da Adenin im Überschuß zugegeben wird, ist das PRPP der begrenzende Reaktionspartner, so daß die Menge des jetzt vorliegenden radioaktiven AMP ein direktes Maß des ursprünglich vorhandenen PRPP ist.

Gewinnung der AMP-Pyrophosphorylase

Ehrlich-Ascitestumorzellen wurden nach Abtrennen der Ascitesflüssigkeit in das 9-fache Volumen von eiskaltem 0,02 m Tris-Puffer (pH 7,4 bei 37°C) gebracht und durch 15-minütiges Pottern im Eisbad

mechanisch aufgeschlossen. Durch Zentrifugieren wurde der Überstand gewonnen. Der Gehalt an unspezifischem Eiweiß konnte durch zweimaliges Einfrieren und anschließendes Zentrifugieren weiter verringert werden.

Der klare, AMP-Pyrophosphorylase-Aktivität enthaltende Überstand wurde für die Bestimmung des PRPP benutzt.

Die oben geschilderte Analysenreaktion wurde durch Zufügen von eiskalter HClO_4 beendet. Das im Ansatz enthaltene Eiweiß wurde durch anschließendes 3-minütiges Erhitzen und Zentrifugieren entfernt. Ein Teil des Überstandes wurde mit einer Hamilton Microliter-Spritze zusammen mit Träger-AMP auf einen $0,4 \times 20,0$ cm messenden Streifen von Chromatographie papier aufgetragen. Die Trennung von Adenin und AMP erfolgte durch aufsteigende Chromatographie in 1%iger Na_2HPO_4 -Lösung. Die Adenin- und AMP-Flecke wurden im UV-Licht lokalisiert, ausgeschnitten und durch dreimalige Behandlung mit $1/10$ n HCl eluiert. Das Eluat wurde im Exsikator eingetrocknet und in einem definierten Volumen von Aqua dest. wieder aufgelöst. Nachdem wassermischbare Szintillatorlösung zugegeben war, wurde die Radioaktivität im Liquidszintillationszähler bestimmt. Aus der Aktivität der Probe und der spezifischen Aktivität des eingesetzten Adenins wurde die Menge des vorhandenen PRPP berechnet.

Alle in den Tabellen und Diagrammen wiedergegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils zwei Parallelansätzen. Die gezeigten Versuche sind repräsentativ für mehrere gleichartige Versuchsgruppen.

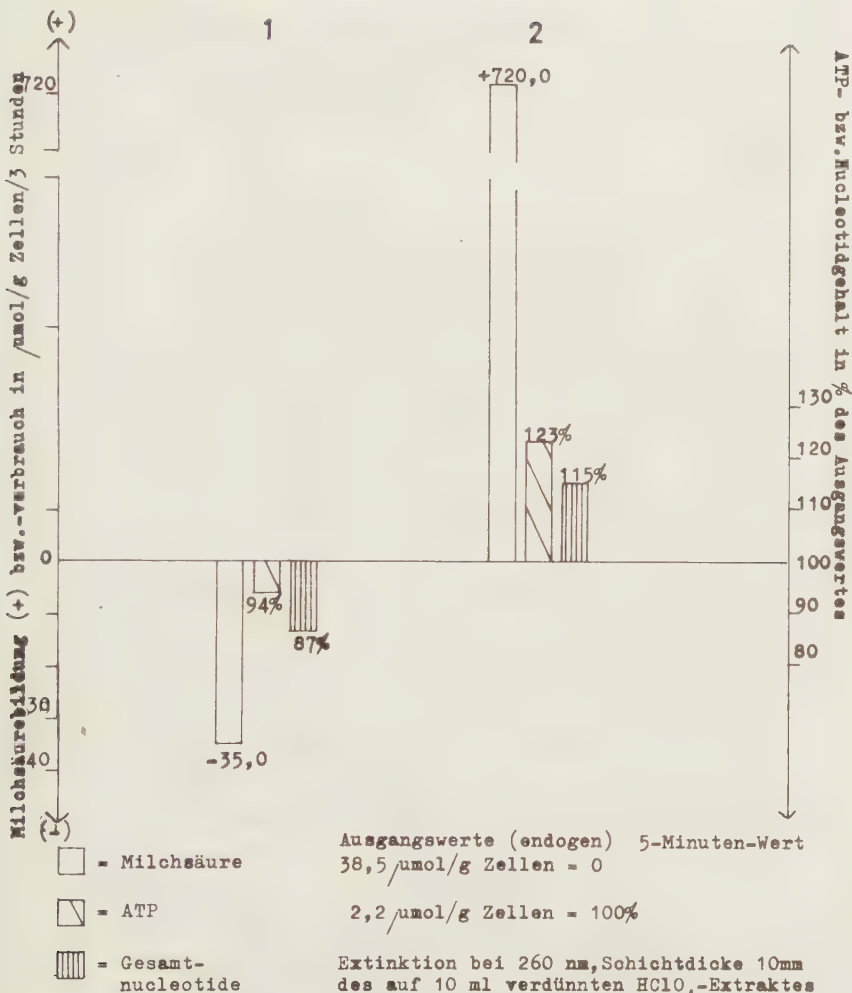
C Ergebnisse

1) ATP- und Gesamtnucleotidgehalte sowie Milchsäurebildung

KUNZ und SCHMID hatten zeigen können, daß bei mehrstündiger Incubation von Tumorzellen in Abwesenheit von Glucose ein Schwund von ATP und Gesamtnucleotiden, schließlich ein Nachlassen des Sauerstoffverbrauches und dann ein Absterben der Zellen eintreten (6). Dieses Ergebnis konnte zunächst bestätigt werden. So zeigt die Abbildung 1 wie es bei Abwesenheit von Glucose im Nährmedium innerhalb von 3 Stunden zu einem Abfall des ATP- und Gesamtnucleotidgehaltes kommt. Gleichzeitig nimmt die Konzentration der im Medium vorhandenen Milchsäure ab.

Im glucosegesättigten Ansatz dagegen steigt der Gehalt an ATP und Gesamtnucleotiden in der gleichen Zeit. Hier findet auch als deutliches Zeichen der glycolytischen Aktivität eine gleichzeitige Nettomilchsäurebildung von ca. 0,76 mmol/g Zellen in 3 Stunden statt. Während sich insoweit noch die experimentellen Befunde mit denen von KUNZ und SCHMID weitgehend

Abb.1



Zu Abb.1: Tumorzellen 8 Tage alt; 50 mg Zellen/5 ml Incubationslösung
 Ausgangswert (Basislinie): 5 Minuten-Incubation ohne Zusatz
 Nr1: 3-Stunden Incubation mit 250 μ g Glutamin
 Nr2: " " " " + 0,2ml Glucose 5,54%lg
 6 x 0,05ml Tris-Puffer

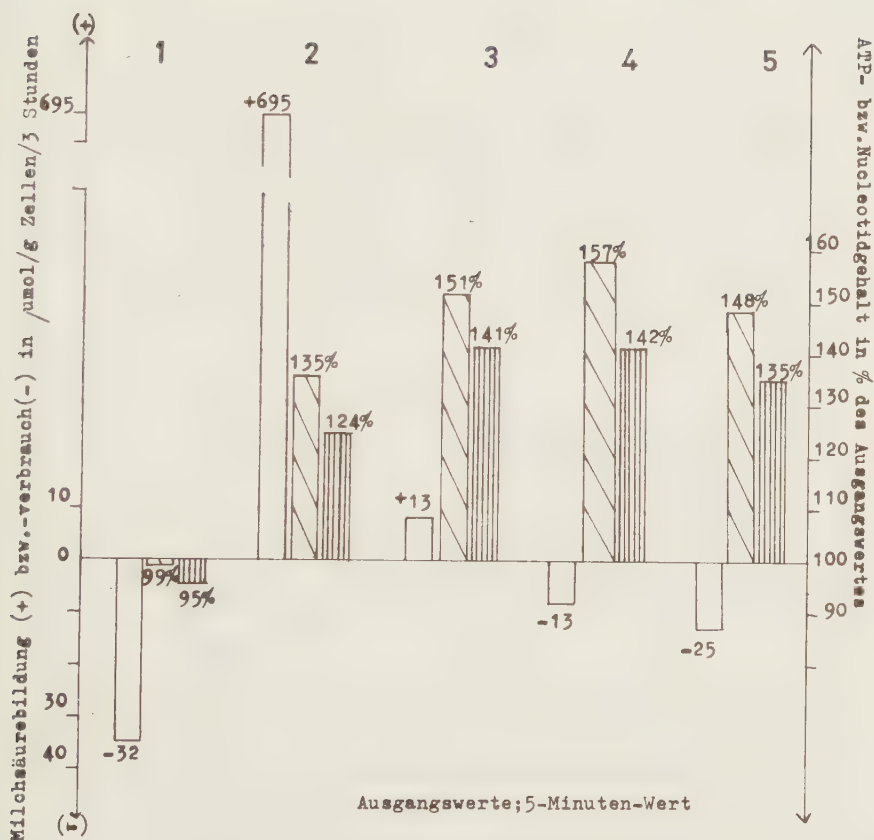
decken, lassen jedoch die in den weiteren Versuchen gefundenen Ergebnisse nicht die gleichen Schlußfolgerungen zu, wie sie von KUNZ und SCHMID vollzogen wurden.

Senkt man nämlich die Glucosekonzentration von 11,0 mM (bei Glucoseüberschuß) und geht gleichzeitig auf intermittierende Gaben von kleinen Glucosemengen über (delta Glucose), so findet man, daß ATP- und Nucleotid-Gehalte noch bei einer 0,038 mM Glucosekonzentration (für die Einzelgabe) einen Maximalwert erreichen. (Abb. 2)

Auch Galactose konnte, wie in diesem Versuch gezeigt wird, die Glucose im Nährmedium voll ersetzen.

Dieser experimentelle Befund erhält jedoch erst seine besondere Bedeutung, wenn man außer dem ATP- und Nucleotidgehalt auch die Nettomilchsäurebildung betrachtet. Es zeigt sich nämlich, daß zwar bei einer 0,054 mM Glucosekonzentration noch eine deutliche, bei einer 0,038 mM Glucosekonzentration jedoch keine Nettomilchsäurebildung stattfindet. In letzterem Fall kommt es bereits zu einem Milchsäureverbrauch.

Trotzdem ist in diesem Fall der ATP- und Nucleotidgehalt nicht kleiner als in dem Ansatz mit hoher Glucosekonzentration und nachweisbarer glycolytischer Aktivität. Die Unabhängigkeit der ATP- und Nucleotidsynthese von einer glycolytischen Aktivität der Zellen wird auch in dem Versuch mit Galactoseüberschuß sehr deutlich. (Abb. 2)



Ausgangswerte; 5-Minuten-Wert

□ = Milchsäure

 $42,42 \mu\text{mol/g Zellen} = 0$

▨ = ATP

 $2,5 \mu\text{mol/g Zellen} = 100\%$

▤ = Gesamt-nucleotide

Extinktion bei 260 nm, Schichtdicke 10mm
 des auf 10 ml verdünnten HClO_4 -Extraktes
 von 50 mg Zellen; $100\% = 0,454^4$ (Extinktion)

Tumorzellen 6 Tage alt; 50 mg Zellen/5ml Incubationslösung
 Ausgangswert (Basislinie): 5 Minuten-Incubation ohne Zusatz

Nr1: 3 Stunden, 250 μg Glutamin

Nr2: " , " +0,2ml Glucose 5,54%ig + 6 x 0,05ml Tris-Puffer

Nr3: " , " + 9 x 0,05ml Glucose 0,1%ig (alle 20 Minuten)

Nr4: " , " + 9 x 0,05ml Glucose 0,07%ig (")

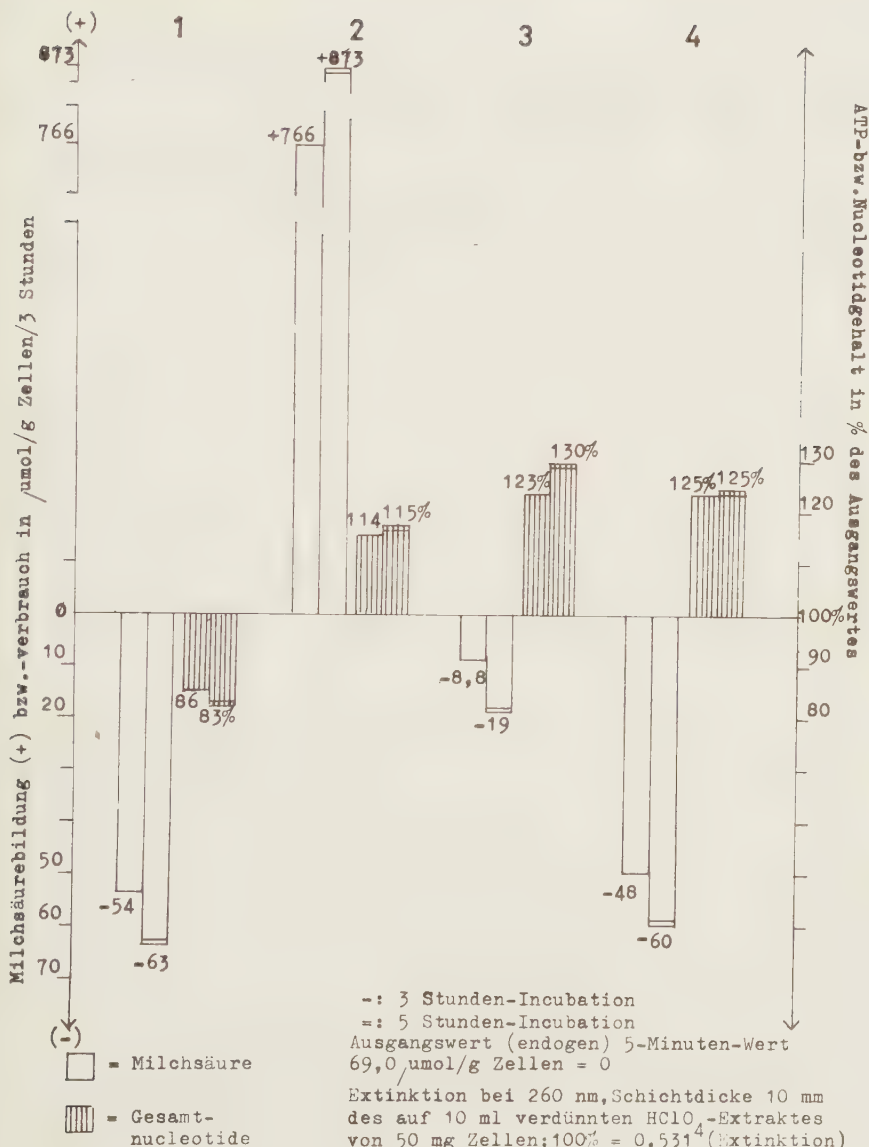
Nr5: " , " +0,2 ml Galactose 5,54%ig

In weiteren Versuchen wurde das Verhalten der Zellen bei 5 und 7 Stunden Incubationsdauer untersucht. Dabei zeigte sich, daß durch die Verlängerung der Incubationsdauer auf 5 Stunden keine wesentlich abweichenden Resultate auftraten. Gegenüber dem 3-Stunden-Ansatz kam es zu einem etwas ausgeprägteren Abfall der Nucleotide im Verarmungsansatz und zu einem nur geringen Zuwachs an Nucleotiden bei Substratzugabe. Aus diesem Grund wurden meistens 3-Stunden-Versuche durchgeführt.

Bei siebenstündiger Incubationsdauer kommt es dann - auch bei Glucoseüberschuß - zu einem deutlichen Abfall des Nucleotidgehaltes im Vergleich mit den 3-Stunden-Ansätzen.

Wahrscheinlich treten dann Verarmungen an für die Syntheseleistungen der Zellen notwendigen Substanzen, z.B.: Aminosäuren etc. auf. (Abb. 3 und 4)

Zum Abschluß dieser Versuchsgruppe soll noch ein Experiment gezeigt werden, das den Einfluß von Glutamin auf den Stoffwechsel der Tumorzellen zeigt. Es ist bekannt, daß unter in vitro Bedingungen das von der Zelle bereitgestellte Glutamin nicht für optimale Syntheseleistungen ausreicht (18).



b.w.

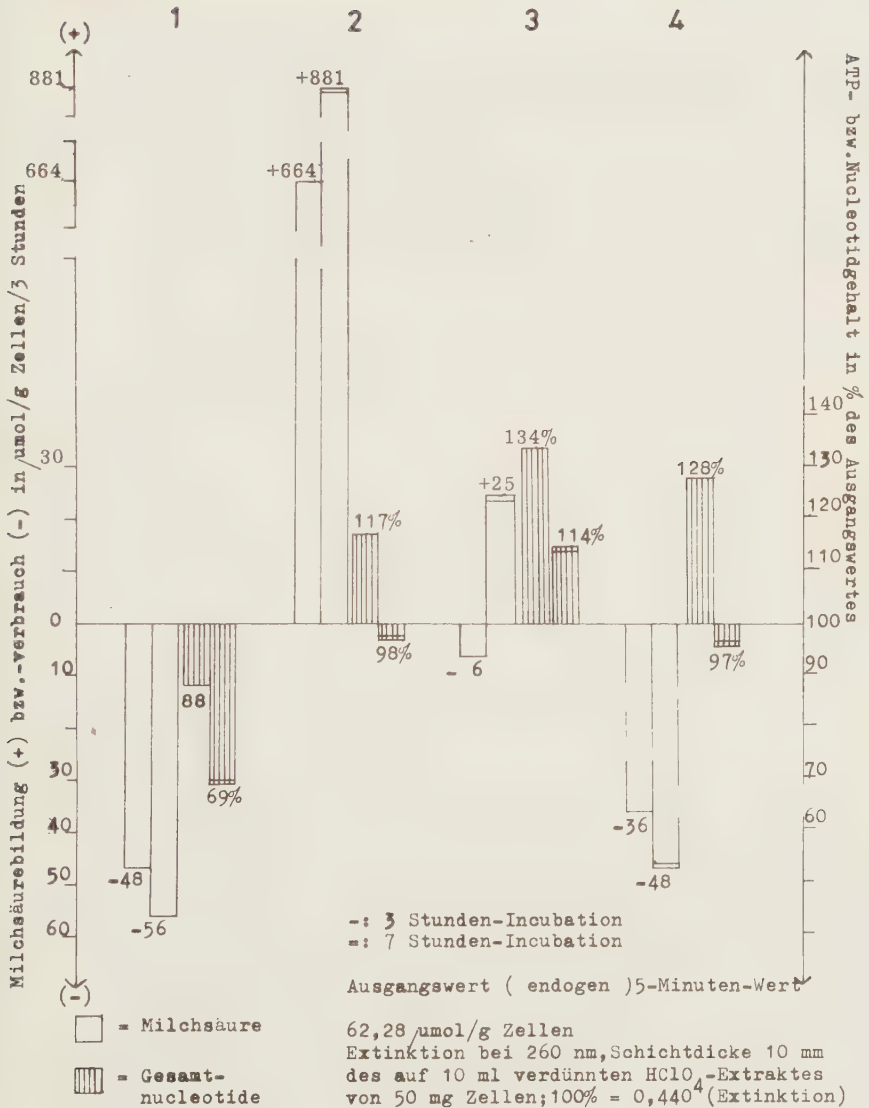
Zu Abbildung Nr.3

Tumorzellen 6 Tage alt; 50mg Zellen/5 ml Incubationslösung
Ausgangswert (Basislinie): 5 Minuten-Incubation

Nr.1: 3 Stunden, 250 µg Glutamin

5	"	,	"	
Nr.2: 3	"	,	"	+0,2ml Glucose 5,54%ig + 6 x 0,05ml Tris-Puffer
5	"	,	"	+ " +10x "
Nr.3: 3	"	,	"	+9 x 0,05ml Glucose 0,07%ig
5	"	,	"	+15 x "
Nr.4: 3	"	,	"	+0,2ml Galactose 5,54%ig
5	"	,	"	+ " "

Abb.4



b.w.

Zu Abbildung Nr.3

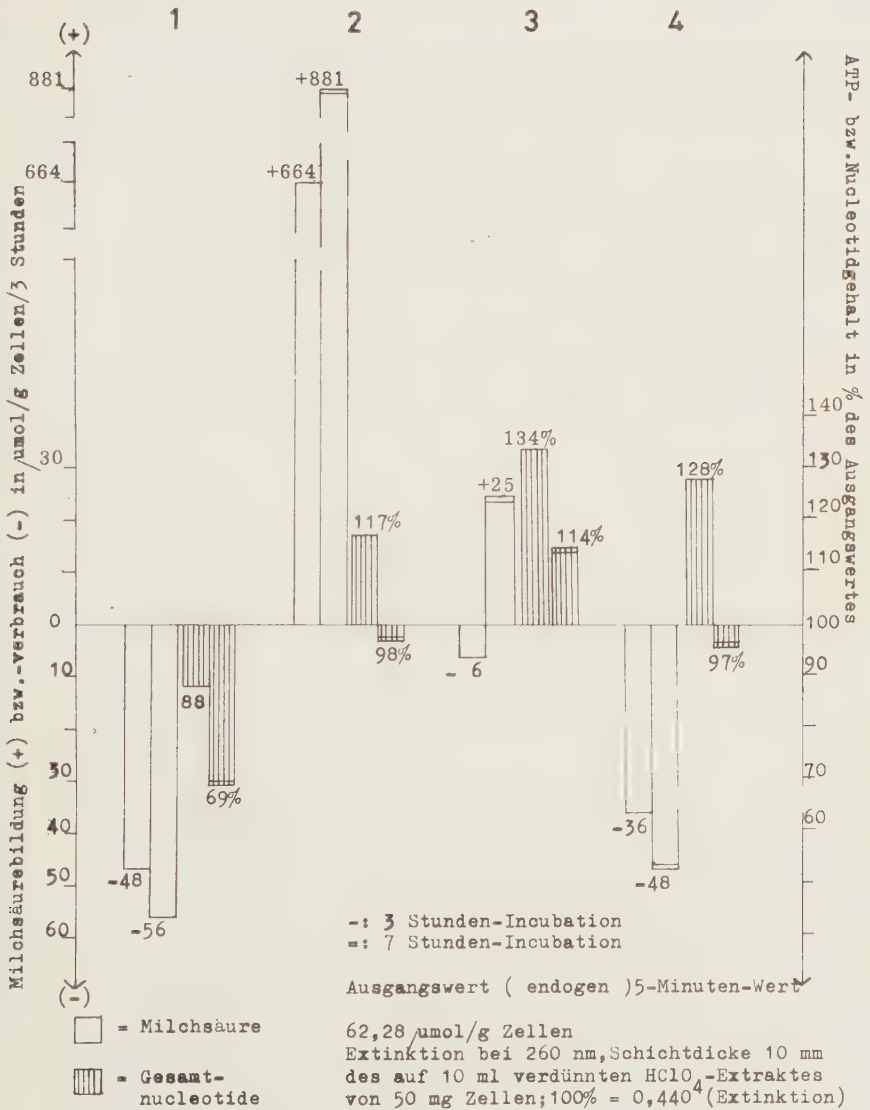
Tumorzellen 6 Tage alt; 50mg Zellen/5 ml Incubationslösung

Ausgangswert (Basislinie): 5 Minuten-Incubation

Nr.1: 3 Stunden, 250 µg Glutamin

5	"	,	"	
Nr.2: 3	"	,	"	+0,2ml Glucose 5,54%ig + 6 x 0,05ml Tris-Puffer
5	"	,	"	+ " +10x "
Nr.3: 3	"	,	"	+9 x 0,05ml Glucose 0,07%ig
5	"	,	"	+15 x "
Nr.4: 3	"	,	"	+0,2ml Galactose 5,54%ig
5	"	,	"	+ " "

Abb.4



b. w.

Zu Abbildung Nr.4

Tumorzellen 7 Tage alt; 50 mg Zellen/5 ml Incubationslösung

Ausgangswert (Basislinie): 5 Minuten-Incubation

Nr.1: 3 Stunden, 250 µg Glutamin

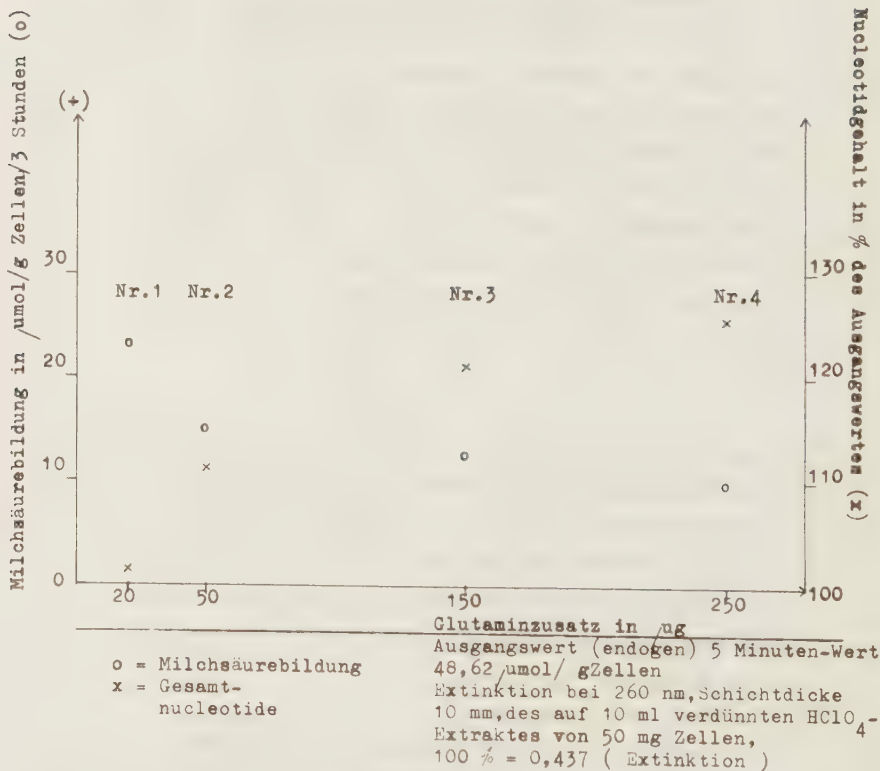
7	"	,	"	
Nr.2:3	"	,	"	+0,2ml Glucose 5,54%ig + 6 x 0,05ml Tris-Puffer
7	"	,	"	+ " +14 x "
Nr.3:3	"	,	"	+ 9 x 0,05 ml Glucose 0,07%ig
7	"	,	"	+21 x "
Nr.4:3	"	,	"	+0,2 ml Galactose 5,54%ig
7	"	,	"	+ "

Den Ansätzen der bisher beschriebenen Versuche (ATP- und Nucleotidgehalt, Nettomilchsäurebildung) wurde deshalb Glutamin zugesetzt. Abbildung 5 zeigt einen Versuch, bei dem eine delta Glucosekonzentration gewählt wurde, die in Abwesenheit von Glutamin noch eine kleine Nettomilchsäurebildung erlaubt. Steigert man nun die Menge des Glutamins im Incubationsmedium, findet eine deutliche, von der Glutaminkonzentration abhängige Steigerung des Nucleotidgehaltes statt, die mit einer gleichzeitigen Senkung der Nettomilchsäurebildung verbunden ist.

Als Ergebnis der bisher durchgeführten Versuche kann man feststellen, daß bei Gaben von delta Glucose bzw. Galactose keine Nettomilchsäurebildung stattfindet. Trotzdem machen sich bei den Zellen nicht nur keine Mangelercheinungen bemerkbar, sondern die Syntheseleistungen sind dabei in der Regel sogar größer als bei voll ablaufender Glycolyse.

Zur Begriffsklärung soll an dieser Stelle daraufhin gewiesen werden, daß eine Glycolyse - im Sinne des Durchlaufens des EMBDEN-MEYERHOF-Weges - natürlich auch dann stattfindet, wenn keine Nettomilchsäureproduktion auftritt. In diesem Fall wird die anfallende Brenztraubensäure restlos in den Citronensäurecyclus eingeschleust. Im Sinne der WARBURG'schen Hypothesen ist jedoch die aerobe Glycolyse verbunden mit dem Auftreten einer Netto- oder Extramilchsäurebildung. So soll der Begriff der aeroben Glycolyse auch im Zusammenhang mit den hier angestellten Überlegungen verstanden werden.

Abb.5



Tumorzellen 7 Tage alt; 50 mg Zellen/5 ml Incubationslösung
Ausgangswert (Basislinie) = 5 Minuten-Incubation ohne Zusatz

Incubationsdauer 3 Stunden

alle Ansätze erhielten 9 x 0,05 ml Glucose 0,1%ig und

Nr.1: 20 μg Glutamin

Nr.2: 50 μg "

Nr.3: 150 μg "

Nr.4: 250 μg "

2) Zwischenprodukte des EMBDEN-MEYERHOF-Weges

Die bisher geschilderten Versuche lassen die Annahme zu, daß die Substrate bei Zugabe von delta Glucose bzw. Galactose nicht über den EMBDEN-MEYERHOF-Weg umgesetzt wurden. Zur näheren Prüfung dieser Frage wurden in weiteren Versuchen die stationären Konzentrationen einiger Intermediate (G-6-P, FDP, DAP und GAP) des EMBDEN-MEYERHOF-Weges bestimmt.

Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wie in den vorangehenden Versuchen betrug die Incubationszeit hier eine Stunde. Auf eine dreistündige Incubation wurde bewußt verzichtet, da anzunehmen ist, daß ein Gleichgewichtszustand der Glycolyseintermediate lange vor Erreichen der maximalen Konzentrationen der möglichen Endprodukte besteht.

Dabei zeigten nur die Ansätze mit Glucoseüberschuß einen deutlich meßbaren Anstieg der Konzentrationen von G-6-P, FDP, DAP und GAP. (Tab. 1)

Da die Konzentrationen in den übrigen Ansätzen unter den bei den obigen Versuchen angewendeten Bedingungen nicht meßbar waren, wurden in weiteren Versuchen sowohl Zellzahl als auch die Konzentrationen der Substrate bis zum Sechsfachen gesteigert. Während sich in den glucosegesättigten Ansätzen die Ausbeute direkt proportional der Zellmenge steigerte, blieben in den anderen Ansätzen die Konzentrationen der Glycolyseintermediate weiterhin unter der Erfassungsgrenze, die jetzt bei etwa 0,049/ μ mol für G-6-P, 0,12/ μ mol für FDP

Tabelle 1

Tumorzellen 5 Tage alt; 50 mg Zellen/5 ml Incubationslösung
Incubationsdauer 1 Stunde; Volumen des Trichloressigsäure-
extraktes der Zellen: 1,57 ml; 0,5 ml des Extraktes kommen
zur Messung.

Zusätze	Gehalt in $\mu\text{mol/g}$ Zellen		
	<u>G-6-P</u>	<u>DAP + GAP</u>	<u>FDP</u>
1.) 250 μg Glutamin 0,2 ml Glucose 5,54%ig 2 x 0,05 ml Tris-Puffer	1,08	1,19	4,48
2.) wie "1" aber ohne Glutamin	0,90	1,23	3,96

Tabelle 2

Tumorzellen 7 Tage alt; 300 mg Zellen/15 ml Incubationslösung
Incubationsdauer 1 Stunde; Volumen des Trichloressigsäure-
extraktes der Zellen: 1,57 ml; 0,1 ml (*) bzw 0,5 ml (+) des
Extraktes kommen zur Messung.

Zusätze	Gehalt in $\mu\text{mol/g}$ Zellen		
	<u>G-6-P</u>	<u>DAP + GAP</u>	<u>FDP</u>
1.) wie in Tab.1	1,22(+)	1,23(*)	4,21(*)
2.) wie in Tab.1	0,89(+)	1,26(*)	4,05(*)

Zu Tab.1 und 2 : Alle übrigen Ansätze zeigten eine Extinktions-
differenz unter 0,010; sie wurden deshalb nicht zur Berechnung
verwertet.

und 0,24/ μ mol für die Summe von DAP und GAP lag, entsprechend einer noch verwertbaren minimalen Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,010$ auf der Photometerskala. (Tab. 2)

Die Angaben verschiedener Autoren über die endogenen Konzentrationen, d.h. die Konzentrationen in frisch entnommenen Tumorzellen, dieser Intermediärprodukte zeigen innerhalb eines bestimmten Bereiches eine gewisse Variabilität (19, 20, 21). Sie liegen im allgemeinen in der Nähe der hier gegebenen Erfassungsgrenze. Man kann daher annehmen, daß für die hier verwendeten Zellen die endogenen Konzentrationen nicht wesentlich unter der Erfassungsgrenze lagen. Sicher ist, daß bei den Versuchen mit Galactose- bzw. Δ Glucosegaben sich der Gehalt nicht wesentlich erhöht haben kann.

Die Milchsäurebestimmung in den entsprechenden Ansätzen mit Galactose- bzw. Δ Glucosegaben hatte gezeigt, daß keine Nettomilchsäurebildung stattfand. Zusätzlich muß man aus dem fehlenden Nachweis von Intermediaten des EMBDEN-MEYERHOF-Weges schließen, daß schon der Eingang dieser Substrate in den Glycolyseweg sehr niedrig sein muß.

Als einzig nachweisbarer Effekt der Galactose- bzw. delta Glucosegaben liegt nach den bisher durchgeführten Versuchen also nur die langfristige Erhöhung des ATP- und Gesamtnucleotidgehaltes vor. Die Nucleotid- und ATP-Synthese ist in den letztgenannten Ansätzen maximal. Die Verwertung der Substrate muß sich also in diesen Fällen in der Hauptsache auf einem anderen Weg als dem der Glycolyse vollziehen.

3) 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat-gehalte

Neben Glycolyse und Atmung ist für den Substratabbau in den Tumorzellen der Pentosephosphatcyclus als oxydativer Abbauweg bekannt.

Der Substratfluß in diesen Abbauweg der verwertbaren C₆-Zucker erfolgt:

1. Über die irreversible Glucose-6-phosphat-Decarboxylierung und
2. über das Transketolase-Transaldolase-System, wobei letztere Reaktionsfolge reversibel ist und so - parallelgeschlossen zum EMBDEN-MEYERHOF-Weg - auch einen Abflußweg zur Glycolyse hin darstellt. Die Aufgabe des Pentosephosphatweges ist u.a. Pentosen zur Synthese der Nucleotide und der Nucleinsäuren bereitzustellen. Die Pentosen liegen dabei zunächst als Ribose-5-phosphat vor, das durch die Reaktion mit ATP in PRPP überführt werden kann. PRPP als energiereiche Form der Ribosen kann dann sowohl zur Neusynthese der Nucleotide aber auch zur direkten

Synthese mit aus Abbauvorgängen der Zelle entstandenen Basen benutzt werden (22, 23, 24).

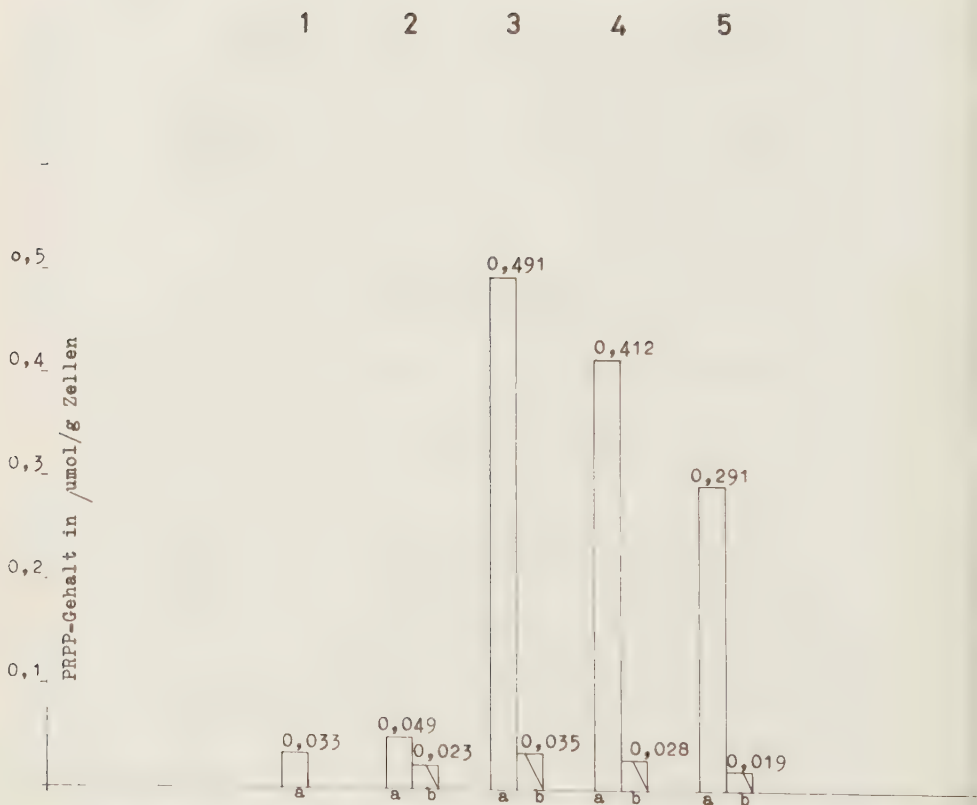
In der letzten Versuchsgruppe wurden die stationären Konzentrationen von PRPP unter den üblichen Versuchsbedingungen gemessen. Dabei betrug die Incubationszeit 60 Minuten. Die Verkürzung der Incubationszeit erfolgte in diesem Fall wegen der von HENDERSON und KHOO an Ehrlich-Ascitestumorzellen erhobenen Befunde, in denen gezeigt werden konnte, daß die Zellen nach Glucosezugabe zum Incubationsmedium nach etwa 40 Minuten einen Plateauwert an PRPP erreichen, der auch durch längere Incubationsdauer nicht gesteigert werden kann (17).

In den hier vorliegenden Versuchen fand sich in den Ansätzen mit Glucoseüberschuß stets die höchste PRPP-Konzentration. Eine geringere, gegenüber dem Ausgangswert der endogenen Konzentration jedoch erhebliche Steigerung trat bei Gaben von Galactose bzw. delta Glucose auf. In den Ansätzen mit Glutamin lag der PRPP-Gehalt unabhängig von Art und Menge der zugesetzten Stoffwechselsubstrate regelmäßig in der Nähe des endogenen Ausgangswertes. (Abb. 6)

Glutamin ist ein direkter Reaktionspartner des PRPP bei der Nucleotidsynthese aus nicht cyclischen Vorstufen. Das wird besonders deutlich in dem in Abbildung 7 gezeigten Versuch. Hier wurde nach 70 minütiger Incubation mit Galactose Glutamin in der üblichen Konzentration zugegeben. Danach erfolgte - als Zeichen des PRPP-Verbrauches - ein rapider Abfall des PRPP-Gehaltes bis in die Nähe des endogenen Ausgangswertes.

Abb.6

- 23 -



Tumorzellen 6 Tage alt; 50mg Zellen/5 ml Incubationslösung; Incubationsdauer 1 Stunde (Nr.2-5), 5 Minuten (Nr.1)

Nr.1: ohne Zusatz

Nr.2a: ohne Zusatz

2b: 250 µg Glutamin

Nr.3a: -

+0,2 ml Glucose 5,54%ig + 2 x 0,05 ml Tris-Puffer

3b: 250 µg Glutamin

+ " " + " "

Nr.4a: -

+0,2 ml Galactose 5,54%ig

4b: 250 µg Glutamin

+ " "

Nr.5a: -

+ 3 x 0,05 ml Glucose 0,07%ig

5b: 250 µg Glutamin

+ " "

Abb.7



Tumorzellen 6 Tage alt; 50mg Zellen/5 ml Incubationslösung
 nach 70minütiger Incubation mit 0,2 ml Galactose 5,54%ig
 Zusatz von 250 µg Glutamin; Messung des PRPP-Gehaltes im
 gleichen Ansatz während 20 Minuten nach Zugabe von Glutamin.

D Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Faßt man die nun vorliegenden Ergebnisse aller Versuche zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

Die Syntheseleistung der Zellen für ATP und Gesamtnucleotide soll in diesen Versuchen als Maß für die den Energie- und Baustoffwechsel betreffende Wirksamkeit eines zugefügten Substrates dienen.

Sowohl die Gabe maximaler Glucosemengen, als auch Galactose und delta Glucosegaben führen in den Incubationsversuchen zu einer deutlichen Steigerung des ATP- und Nucleotidgehaltes. Delta Glucose- und Galactosegaben sind dabei der Glucosesättigung leicht überlegen.

Durch die Bestimmung von Zwischenprodukten des EMBDEN-MEYERHOF-Weges und des Pentosephosphatweges sollte ein Hinweis erhalten werden, auf welchem Wege die Tumorzellen die zugefügten Substrate umsetzen.

Bei Glucoseüberschuß im Medium erfolgt eine Stimulierung des EMBDEN-MEYERHOF-Weges und des Pentosephosphatweges. Bei Gaben von Galactose und delta Glucose ist nur das PRPP als Zwischenprodukt faßbar, d.h., daß die Substrate im wesentlichen über den Pentosephosphatweg umgesetzt werden.

Als ein Endprodukt des Glucosestoffwechsels in Tumorzellen ist auch die Milchsäure anzusehen. Hier findet man bei Glucoseüberschuß eine deutliche und maximale Milchsäureproduktion, während bei Galactose- und delta Glucosegaben die Nettomilchsäureproduktion ausbleibt und es sogar durch Verbrauch zu einem Absinken des im Medium vorliegenden Milchsäuregehaltes kommt.

Die Deutung dieser Befunde soll nun in der abschließenden Diskussion erfolgen.

E Diskussion

Unterschiedliche Reaktionen von Ehrlich-Ascitestumorzellen auf verschieden hohe Konzentrationen von Glucose im Incubationsmedium sind schon von mehreren Autoren beschrieben worden (8, 21, 25, 26, 27, 28) und sind auf ein unterschiedliches Fermentmuster der jeweilig benutzten Zellen (21) oder bei der Verwendung verschiedenen großer Zellkonzentrationen bei gleichen Substratkonzentrationen auf einen bei an sich aeroben Versuchsbedingungen eintretenden Sauerstoffmangel zurückgeführt worden (27).

Die zum Teil nicht übereinstimmenden Resultate lassen sich erklären, wenn man annimmt, daß die gleiche Tumorzelle auf unterschiedliche Glucosekonzentrationen in einem bestimmten Konzentrationsbereich unterschiedliche Stoffwechselreaktionen zeigt. Diese Annahme scheint durch die hier vorgetragenen Versuche hinreichend begründet zu sein.

Ob bei den in diesen Versuchen benutzten Zellen ein gegenüber den Versuchstumoren der anderen Autoren unterschiedliches Fermentmuster vorliegt, kann auf Grund der hier vorliegenden Versuche allein nicht entschieden werden.

Ein Sauerstoffmangel, wie er sich bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen bemerkbar machen sollte (27), liegt für die Zellen bei den hier gegebenen Bedingungen sicher nicht vor. Dafür sprechen mehrere Tatsachen:

Nimmt man für die Zellen einen relativ hohen Q_{O_2} von -15 (bei Abwesenheit von Glucose im Nährmedium²) an, so würden 10 mg Zellen (10 mg Trockengewicht = 50 mg Feuchtgewicht) in einer Stunde 0,15 ml O_2 , in 3 Stunden 0,45 ml O_2 verbrauchen. Der Gasraum der hier benutzten Incubationsgefäße faßt 30 ml Luft = 6 ml O_2 , so daß der Sauerstoffgehalt während der Versuchsperiode nur geringfügig abnimmt.

Bei gleichen Zellkonzentrationen und gleichen Gasvolumina müßte ein Sauerstoffmangel alle Ansätze gleichmäßig treffen und könnte so nicht für die unterschiedliche Syntheseleistung bei verschiedenen Substratkonzentrationen verantwortlich gemacht werden. Ein Mangelzustand für die Zellen macht sich, wie aus den 7-Stunden-Incubationen ersichtlich wird, erst später bemerkbar und ist dann sicherlich auf den Mangel an endogenen Substraten, Aminosäuren, aktivierten C_1 -Bruchstücken etc. zurückzuführen. Dabei sind wiederum alle Ansätze gleichmäßig betroffen.

LEE und COE haben in einer ihrer Arbeiten unter anderem auch den unterschiedlichen Effekt von wechselnden Glucosekonzentrationen auf den Stoffwechsel von Ehrlich-Ascitestumorzellen studiert (8). Die Glucosekonzentrationen variierten dabei zwischen 0,154 mM maximal und 0,077 mM minimal. In den hier vorliegenden Versuchen liegen die maximalen Konzentrationen bei Glucoseüberschuß bei 11,0 mM und die minimalen bei 0,037 mM für die Einzelgabe bei delta Glucose.

Die Autoren fanden, - und machten dies auch zu einer Grundlage ihrer Überlegungen - daß die während der Incubation verbrauchte Menge Glucose quantitativ der Summe der wiedergefundenen Glycolyseintermediate entsprach. Weiterhin ergab sich aus ihren Versuchen, daß mit der Zunahme der glycolytischen Phosphorylierung nach Glucosegabe die Rate der oxydativen Phosphorylierung sank.

Zur Deutung ihrer Befunde zogen sie die Ergebnisse anderer Autoren hinzu. So hatten WU und RACKER gefunden, daß nach Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung in glycolysierenden Zellen durch Dinitrophenol die ATP-Synthese durch einen kompensatorischen Anstieg der Glycolyse erhalten wird, wobei der ATP-Spiegel unverändert bleibt. (29).

Im Gegensatz dazu fällt der ATP-Spiegel schnell ab, wenn die Zellen mit Jodacetat oder Oxamat vergiftet werden. Die ATP-Syntheserate kann für einen kurzen Zeitraum nach Glucosezugabe durch eine Steigerung der Atmung erhalten werden (30). Aus diesen Ergebnissen und den eigenen Befunden schlossen LEE und COE, daß zwar Glycolyse oder Atmung die ATP-Synthese unterstützen können, daß aber nach Glucosegabe die Glycolyse verantwortlich für die Erhaltung des ATP-Spiegels ist.

Diese Schlußfolgerung, ebenso wie die anfangs von KUNZ und SCHMID (6) zitierte, stehen im Widerspruch zu den hier vorgelegten Ergebnissen.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse müssen jedoch einige Tatsachen berücksichtigt werden:

1. Bei den vorliegenden Versuchen handelt es sich hauptsächlich um Langzeitincubationen von 3 Stunden Dauer.
2. Die Glucosekonzentrationen lagen in den Versuchen mit delta Glucose unter den minimalen Konzentrationen der Versuche von LEE und anderen.
3. Den Ansätzen wurde Glutamin zugefügt.

Zu 1:

Ziel der Versuche war, die Syntheseleistung der Zellen zu untersuchen. Gerade für die Neusynthese von Nucleotiden scheint die Zelle erst nach längerer Zeit einen Gleichgewichtszustand zu erreichen, wobei die Zwischenprodukte schon eher im Gleichgewicht vorliegen.

Zu 2:

Es gibt mehrere Hinweise, daß Tumorzellen bei sehr niedrigen Glucosekonzentrationen ein gegenüber den allgemein bekannten Charakteristika ihres Stoffwechsels unterschiedliches Verhalten zeigen. So in den schon anfangs erwähnten Arbeiten (8, 21, 25, 26, 27). Insbesondere konnten BLOCH-FRANKENTHAL und WEINHOUSE (26) und RACKER (28) zeigen, daß bei niedrigen Glucosekonzentrationen der Sauerstoffverbrauch der Zellen identisch ist mit dem endogenen = maximalen Verbrauch.

Darüberhinaus fanden BRIN und Mc KEE (31), KUN, TALALAY und WILLIAMS-ASHMAN (32), daß der hemmende Effekt von Glucose auf die Atmung von Tumorzellen - im Sinne des CRABTREE-Effektes - bei niedrigen Glucosekonzentrationen wegfiel, und es eher zu einer Erhöhung der Sauerstoffaufnahme kam. Auch HESS und CHANCE fanden bei niedrigen Glucosekonzentrationen eine anfängliche Stimulierung der Atmung, die dem Betrag der zugefügten Glucose proportional war (33).

Zu 2:

Bei Glucoseüberschuß im Medium kommt es zu einem starken Einstrom von Glucose in die Zellen und die klassische aerobe Glycolyse mit ausgeprägter Milchsäurebildung setzt ein. Gleichzeitig steigen erwartungsgemäß ATP- und Nucleotidgehalte. Senkt man nun die Glucosekonzentration, so bleibt die Steigerung des Nucleotidgehaltes bestehen (Abb. 2). Man erreicht schließlich eine kritische Glucosekonzentration, die für die hier benutzten Zellen zwischen $0,054/\mu\text{mol}$ und $0,038/\mu\text{mol}$ pro ml Medium liegen muß, wo es bei weiterhin optimaler- und sogar gesteigerter - Nucleotidbildung zu einem Versiegen der Nettomilchsäureproduktion kommt. HESS hat die Glucosekonzentration in der Ascitesflüssigkeit der Ehrlich-Ascitestumorzellen mit $0,1/\mu\text{mol/ml}$ angegeben (19). Durch eine einmalige Gabe von delta Glucose wird die Konzentration im Incubationsmedium um $0,038/\mu\text{mol/ml}$ erhöht. Bei einer Incubationsdauer von 3 Stunden wird durch die in 20-minütigen Abständen

erfolgende Zufuhr von jeweils 0,2/ μ mol Glucose eine Gesamtmenge von 180/ μ mol Glucose zugefügt. BLOCH-FRANKENTHAL und WEINHOUSE haben zeigen können, daß eine 6,6%ige Zellsuspension in einer 2,5 mmolaren Glucoselösung die zugefügte Glucose in einer halben Stunde völlig abbaut und in Milchsäure umwandelt (26). Man kann also für die hier vorliegenden Versuche annehmen, daß die Zellen in den 20-Minuten-Intervallen die zugefügte Glucose voll umsetzen, es nicht zu einer Glucoseaccumulation kommt und daß das physiologische Milieu der Zellen nur sehr geringgradig verändert wird. Ein ständig auf sehr niedrigem Niveau gehaltener Glucosespiegel im Incubationsmedium ist für die hier gezeigten Zellreaktionen sicher von entscheidender Bedeutung. Deutlich wird das besonders in den Versuchen mit Galactoseüberschuß im Medium.

Galactose wurde dabei in der gleichen Konzentration zugegeben wie die maximal dosierte Glucose (11,0 mM). Galactose wird von den Tumorzellen nur in geringem Maße umgesetzt und zwar durch die Umwandlung in Glucose über die bekannten Zwischenstufen. Hier erfolgt also ein kontinuierlicher Einstrom kleinster Mengen verwertbaren Substrates. Dennoch führt diese minimale Verschiebung der endogenen Stoffwechsellage zu einem maximalen Gehalt von ATP und Nucleotiden.

Zu 3:

Es ist schon anfangs erwähnt worden, daß für In-vitro-Versuche die von den Zellen bereitgestellte Menge Glutamin für optimale Syntheseleistungen nicht ausreichend ist. Glutamin zum Incubationsmedium zugesetzt steigert deutlich die Nucleotidsynthese (Abb. 5). Es gibt keine bekannte Stoffwechselreaktion, die unmittelbar durch eine Steigerung der Glutaminkonzentration zu einer Steigerung der Glycolyse führt. Diese Tatsache und der Befund, daß es zu einem Versiegen der Nettomilchsäureproduktion bei Gaben von Galactose bzw. delta Glucose kommt, zeigen, daß von den Tumorzellen unter diesen Bedingungen die Glucose nicht über die Glycolyse, sondern auf einem anderen Stoffwechselweg umgesetzt wird. Das heißt aber auch gleichzeitig, daß die Tumorzellen im Gegensatz zu den von KUNZ und SCHMID und anderen bereits zitierten Autoren erhobenen Befunden nicht auf die Energie der Glycolyse zur Aufrechterhaltung und Vermehrung ihres ATP- und Nucleotidbestandes angewiesen sind.

Diese Vermutung wurde weiterhin bestätigt durch den fehlenden Nachweis einer deutlichen Erhöhung der G-6-P-, FDP-, DAP- und GAP-Konzentrationen bei delta Glucose- und Galactosegaben.

Bei Glucosesättigung bewegten sich die Werte für diese Glycolyseintermediate in den in einer Übersicht von COE (21) und zuletzt von GUMÄA und McLEAN (20) berichteten Konzentrationen, so daß hier sicherlich

keine unterschiedlichen Fermentmuster für die unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Substratkonzentrationen verantwortlich gemacht werden können. Glutamin wird in den Zellen zur Synthese des Puringerüstes und damit zur Synthese der Nucleotide gebraucht.

Direkter Reaktionspartner des Glutamins ist dabei das PRPP, das aus einer Reaktion von Ribose-5-phosphat mit ATP entsteht, wobei diese Reaktion irreversibel ist (34). Auch die Reaktionen, die zu einem Verbrauch des PRPP führen, sind irreversibel (35, 36).

Für die Bildung von Pentosen stehen den Tumorzellen zwei Stoffwechselwege zur Verfügung:

1. Die irreversible Decarboxylierung von Glucose-6-phosphat und
2. der Weg über das Transketolase-Transaldolase-System. Bei fehlendem Nachweis einer Aktivierung der Glycolyse durch die Galactose- bzw. delta Glucosegaben und den oben erwähnten Einfluß von Glutamin auf den Stoffwechsel der Tumorzellen - Erhöhung der Nucleotidsyntheserate - lag die Annahme nah, daß unter diesen Bedingungen die Substrate zum größten Teil über einen der beiden zuvor genannten Wege abgebaut werden.

In diesem Zusammenhang soll ein Befund von MURRAY zitiert werden, der die Aktivität der AMP-Pyrophosphorylase, dem Ferment, das die Reaktion:



katalysiert, in verschiedenen Mäusegeweben und in Ehrlich-Ascitestumorzellen bestimmt hat. MURRAY konnte zeigen, daß die Tumorzellen eine gegenüber regenerierender Mäuseleber 15-fach und gegenüber anderen Mäusegeweben bis zu 60-fach größere Konzentration dieses Fermentes besaßen. Die Konzentration des Fermentes variierte mit dem Alter der Zellen. Es bestand aber keine direkte Relation zwischen der Enzymaktivität und der Zellteilungsrate (37).

Die erhöhte Konzentration dieses Fermentes in den Tumorzellen - unabhängig von der Zellteilungsrate - ist biologisch sinnvoll nur dann, wenn gleichzeitig damit ein erhöhter Substratumsatz auf dem so katalysierten Stoffwechselweg verbunden ist.

HENDERSON und KHOO haben in ihren Arbeiten die Synthese von PRPP und seine Verfügbarkeit zur Ribonucleotidsynthese in Ehrlich-Ascitestumorzellen studiert (17, 38). Dabei muß wieder vorausgeschickt werden, daß die Autoren Glucosekonzentrationen von maximal 11,0 mM und minimal 0,055 mM für ihre Untersuchungen wählten. Die Konzentrationen in den hier vorliegenden Versuchen liegen bei maximal 11,5 mM und 0,038 mM minimal. Die Glucosekonzentrationen bei den Versuchen von HENDERSON und Mitarbeitern lagen noch in dem Bereich,

wo die umgesetzte Glucose - nach Angaben anderer bereits zitierter Autoren - nahezu vollständig in den Glycolyseintermediaten bzw. als Milchsäure wiedergefunden werden kann.

Bei Glucosekonzentrationen unter 0,55 mM konnten die Tumorzellen bei den Versuchen von HENDERSON den maximalen PRPP-Spiegel nicht mehr erhalten. Galactose zeigte in den Versuchen eine gegenüber der Glucose kleinere Wirksamkeit in Bezug auf die PRPP-Synthese.

In den hier vorliegenden Versuchen zeigte sich eine maximale PRPP-Synthese bei Glucoseüberschuß. Die Werte für Galactose- und delta Glucosegaben lagen unter diesen Maximalwerten, obwohl unter diesen Bedingungen die ATP- und Nucleotidgehalte höher lagen als bei Glucoseüberschuß. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch könnte sich aus der von HENDERSON und KHOO getroffenen Unterscheidung in "freies" und "verfügbares" PRPP ergeben (38).

Als freies PRPP bezeichnen die Autoren das aus der Zelle extrahierte und als solches nachweisbare PRPP, das, wenn es nicht in nachgeschalteten Stoffwechselprozessen verbraucht wird, nur bis zum Erreichen einer bestimmten Konzentration von der Zelle synthetisiert wird.

Wird das PRPP jedoch z.B. durch Zusatz von Glutamin zum Incubationsmedium sofort verbraucht, wird ständig neues PRPP nachsynthetisiert, das - durch

direkte Messungen nicht erfaßbar - summenmäßig den Plateauwert übertrifft. Das zusätzlich synthetisierte PRPP bezeichnen die Autoren als freies PRPP. HENDERSON und andere Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch davon, daß ein Verbrauch des PRPP für die Nucleotidsynthese den Fluß der Metabolite über den oxydativen Weg des Pentosephosphatcyclus steigert (20, 38, 39, 40).

Eine Erklärung für den niedrigen PRPP-Spiegel bei gleichzeitig hohen ATP- und Nucleotidgehalten unter dem Einfluß von Galactose- und delta Glucosegaben wäre, daß unter diesen Bedingungen - indirekt ablesbar an der ATP- und Nucleotidsynthese - die PRPP verbrauchenden Reaktionen stärker wirksam sind als bei Glucoseüberschuß, so daß nur in letzterem Fall der maximale Gehalt an freiem PRPP nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig müßte man annehmen, daß bei Glucoseüberschuß - obwohl der PRPP-Gehalt maximal ist - eine Verwertungshemmung für das PRPP vorliegt.

Sollte unter den Bedingungen kleiner intermittierender Gaben von Glucose und Anwesenheit von Glutamin im Incubationsmedium die Glucose bevorzugt über den Weg:



umgesetzt werden, müßte eine weitere Voraussetzung erfüllt sein. Der Pentosephosphatcyclus dürfte nicht

vorwiegend im Sinne eines cyclischen Ablaufes reagieren. Diese Möglichkeit scheint aber durch die Befunde anderer Autoren gesichert zu sein. So hat HORECKER schon darauf hingewiesen, daß der Pentosephosphat-cyclus in tierischen Zellen nicht als Kreisreaktion, sondern eher als ein aus zwei parallelen Stoffwechselwegen bestehender Mechanismus wirkt, durch den Hexosen in Pentosen überführt werden (41).

In neuerer Zeit ist diese Vermutung durch Versuche von GUMMIA und McLEAN bestätigt worden (20). Auch diese Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß der Pentosephosphatcyclus besonders bei gesteigertem Verbrauch des Ribose-5-phosphates im Sinne einer Umwandlung von Hexosen in Pentosen wirksam ist. Diese Bedingungen scheinen - gemessen an den Befunden - in den hier geschilderten Versuchen vorzuliegen.

F Zusammenfassung

Das Stoffwechselverhalten von Ehrlich-Ascitestumorzellen wurde bei Glucose- und Galactoseüberschuß und bei intermittierenden Gaben kleiner Mengen Glucose untersucht. Bei Glucoseüberschuß zeigen die Zellen eine erwartete hohe aerobe Glycolyse, kenntlich an einer großen Milchsäurebildungsrate. Ohne auf die Energie der Glycolyse angewiesen zu sein - sichtbar am Versiegen der Nettomilchsäureproduktion - können die Zellen jedoch bei Galactose- und delta Glucosegaben weiterhin ATP- und Nucleotidspiegel unverändert erhalten und sind unter diesen Bedingungen offenbar zur maximalen Syntheseleistung befähigt.

Als faßbare Zwischenprodukte findet man bei Glucoseüberschuß G-6-P, FDP, DAP, GAP und PRPP, als Endprodukte Milchsäure, Nucleotide und ATP. Bei Galactose- und delta Glucosegaben findet man als Zwischenprodukt nur PRPP, als Endprodukte Nucleotide und ATP.

Aus diesen Befunden wird geschlossen, daß Ehrlich-Ascitestumorzellen zur Aufrechterhaltung ihrer Zellfunktionen nicht auf ihre glycolytische Kapazität angewiesen sind, sondern ihren Energie- und Baustoffwechsel aus der Atmung decken können. Sie benötigen jedoch minimale Mengen Glucose, aus der über den Pentosephosphatweg Nucleotide synthetisiert werden müssen.

G Literaturverzeichnis

1. WARBURG, O.: Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. Biochem. Z. 142, 317-333 (1923).
2. WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer-Verlag, Berlin 1926.
3. WARBURG, O.: Über die Entstehung der Krebszellen. Naturwissenschaften 42, 401-406 (1955).
4. WARBURG, O.: On the Origin of Cancer Cells. Science 123, 309-314 (1956).
5. HOLZER, H., J. HAAN, D. PETTE: Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. II. Wachstumshemmung des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Carcinoms mit Jodacetat. Biochem. Z. 327, 195-201 (1955)
6. KUNZ, W., W. SCHMID: Über Beziehungen zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und Adenylsäuresystem bei der Ehrlich-Ascitestumorzelle. Zeitschrift für Naturforschung 12, 743-751 (1957).
7. TERRANOVA, T., F. FEO, E. GRAVELA, L. GABRIEL: Die Wirkung der 2-Desoxyglucose auf den energetischen Stoffwechsel und auf die Proteinsynthese von Tumorzellen und Normalzellen. Zeitschrift f. Krebsforschung 66, 41-45 (1964).
8. LEE, I.-Y., E. L. COE: Theoretical Phosphorylation Rates after Addition of a Small Amount of Glucose to Intact Ascites Tumor Cells. Biochem. Biophys. Acta 131, 441-452 (1967).
9. SCHMIDT, C. G.: Über die biologische Oxydation und Glycolyse in den Tumoren. Klin. Wschr. 17/18, 409-419 (1955).
10. WEINHOUSE, S.: On Respiratory Impairment in Cancer Cells. Science 124, 267-268 (1956).

11. RUECKERT, R., C.G. MUELLER: Growth of HeLa-Cells on Galactose. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2, 340-341 (1958).
12. EAGLE, H., S. BARBAN, M. LEVY, H.O. SCHULZE: The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures. *J. Biol. Chem.* 233, 551-558 (1958).
13. LETTRE, W.: Probleme und Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung. *Ärztl. Sammelbl.* 49, 111-118 (1960).
14. GRAFF, S., H. MOSER, O. KASTNER, A.M. GRAFF, M. TANNENBAUM: The Significance of Glycolysis. *J. Nat. Cancer Inst.* 34, 511-519 (1965).
15. HENDERSON, J.F., G.A. LE PAGE: Purine Biosynthesis de Novo in Mouse Tissue and a Mouse Tumor. *J. Biol. Chem.* 234, 2364-2368 (1959).
16. BERGMAYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.
17. HENDERSON, J.F., M.K.Y. KHOO: Synthesis of 5-Phosphoribosyl 1-Pyrophosphate from Glucose in Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vitro. *J. Biol. Chem.* 240, 2349-2357 (1965).
18. RABINOVITZ, M., M.E. OLSON, D.M. GREENBERG: Rôle of Glutamine in Protein Synthesis by the Ehrlich Ascites Carcinoma. *J. Biol. Chem.* 222, 879-893 (1956).
19. HESS, B.: Koordination von Atmung und Glycolyse. *Mitteilungsdienst GBK*, Bd 3, Heft 1, 643-668 (1956).
20. GUMAA, K.A., P. Mc LEAN: The Pentose Phosphat Pathway of Glucose Metabolism (Enzyme Profiles and Transient and Steady-State Content of Intermediates of Alternative Pathways of Glucose Metabolism in Krebs Ascites Cells). *Biochem. J.* 115, 1009-1029 (1969).

21. COE, E.L.: Correlations between Adenine Nucleotide Levels and the Velocities of Rate-Determining Steps in the Glycolysis and Respiration of Intact Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 495-511 (1966).
22. GOLDTHWAIT, D.A.: 5-Phosphoribosylamine a precursor of Glycinamide Ribotide. *J. Biol. Chem.* 222, 1051-1068 (1956).
23. GOLDTHWAIT, D.A., R.A. PEABODY, G.R. GREENBERG: On the Mechanism of Synthesis of Glycinamide and Ribotide and its Formyl Derivative. *J. Biol. Chem.* 221, 569-577 (1956).
24. FLAKS, J.G., M.J. ERWIN, J.M. BUCHANAN: Biosynthesis of the Purines. *J. Biol. Chem.* 228, 201-229 (1957).
25. RACKER, E.: Carbohydrate Metabolism in Ascites Tumor Cells. *Ann. N.Y. Acad. Soc.* 63, 1017-1021 (1955).
26. BLOCH-FRANKENTHAL, L., S. WEINHOUSE: Metabolism of Neoplastic Tissue. XII Effects of Glucose Concentration on Respiration and Glycolysis of Ascites Tumor Cells. *Cancer R.* 17, 1082-1090 (1957).
27. OVERGAARD-HANSEN, K.: Metabolic Regulation of the Adenine Nucleotide Pool. 1 Studies on the Transient Exhaustion of the Adenine Nucleotides by Glucose in Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 104, 330-347 (1965).
28. LEE, I.-Y., R.C. STRUNK, E.L. COE: Coordination among Rate-Limiting Steps of Glycolysis and Respiration in Intact Ascites Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 242, 2021-2028 (1967).
29. WU, R., E. RACKER: Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism. IV Pasteur Effect and Crabtree Effect in Ascites Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 234, 1036-1041 (1959).

30. COE, E.L.: The Reversal of the Crabtree Effect by Iodoacetate. *Biochim. Biophys. Acta* 93, 209-211 (1964).
31. BRIN, M., R.W. Mc KEE: The Inhibition of Respiration by Glucose, Fructose and Mannose in the Ehrlich-Mouse Ascites Tumor. *Cancer R.* 16, 364-368 (1956).
32. KUN, E., P. TALALAY, H.G. WILLIAMS-ASHMAN: Studies on the Ehrlich Ascites Tumor. I The Enzymic and Metabolic Activities of the Ascites Cells and the Ascitic Plasma. *Cancer R.* 11, 855-863 (1951).
33. HESS, B., B. CHANCE: Phosphorylation Efficiency of the Intact Cell. 1. Glucose-Oxygen Titrations in Ascites Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 234, 3031-3035 (1959).
34. KORNBERG, A., I. LIEBERMAN, E.S. SIMMS: Enzymatic Synthesis and Properties of 5-Phosphoribosylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 215, 389-402 (1955).
35. KORNBERG, A., I. LIEBERMAN, E.S. SIMMS: Enzymatic Synthesis of Purine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 215, 417-427 (1955).
36. HATFIELD, D., J.B. WYNGAARDEN: 3-Ribosylpurines. *J. Biol. Chem.* 239, 2580-2586 (1964).
37. MURRAY, A.W.: Purine-Phosphoribosyltransferase Activities in Rat and Mouse Tissues and in Ehrlich Ascites-Tumor Cells. *Biochem. J.* 100, 664-670 (1966).
38. HENDERSON, J.F., M.K.Y. KHOO: Availability of 5-Phosphoribosyl 1-Pyrophosphate for Ribonucleotide Synthesis in Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vitro. *J. Biol. Chem.* 240, 2358-2362 (1965).
39. ELLIS, D.B., P.G. SCHOLEFIELD: The Effects of Adenine and Glucose on Synthesis of Nucleotides by Ehrlich Ascites Carcinoma Cells in Vitro. *Can. J. Biochem. a. Physiol.* 40, 343-352 (1962).

40. UPPIN, B.I., P.G. SCHOLEFIELD: Studies on the Biosynthesis of Nucleotides in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells in Vitro. Can. J. Biochem. a. Physiol. 43, 209-224 (1965).
41. HORECKER, B.L.: In "Ciba Lect. Microbial Biochemistry: Pentose Metabolism in Bacteria". NY. and London J. Wiley a. Sons Inc. (1962).

H Anhang

Belegprotokoll zu Abb. 2

Ascitesgewinnung aus drei Tieren 6 Tage nach Implantation.
Zellgewichtsbestimmung im Haematokritröhrchen. Verdünnung des
Ascites mit eiskaltem Incubationsmedium auf einen Gehalt von
50 mg. Zellen/ 5 ml.

Beschicken der Incubationsgefäße mit den Substraten. Es wurden
immer 2 Parallelversuche angesetzt.

Nr.	Incubations- zeit	Zusätze
0	5 Minuten	ohne
1	3 Stunden	250 µg Glutamin in 0,1 ml Aqua dest.
2	"	Glutamin wie in Nr. 1 + 0,2 ml Glucose- lösung 5,54%ig + 0,05 ml Tris-Puffer 0,31 M (weiter alle 30 Minuten)
3	"	Glutamin wie in Nr. 1 + 0,05 ml Glucose- lösung 0,1%ig (weiter alle 20 Minuten)
4	"	Glutamin wie in Nr. 1 + 0,05 ml Glucose- lösung 0,07%ig (weiter alle 20 Minuten)
5	"	Glutamin wie in Nr. 1 + 0,2 ml Galactose- lösung 5,54%ig.

Zur O-Zeit Zugabe von 5 ml Zellsuspension und Einbringen der
Incubationsgefäße in den Schüttelincubator bei 37°C.
Beenden der Incubation durch Abkühlen im Eisbad.

Überführen des Incubates in eisgekühlte Zentrifugenröhrchen.
Spülen der Incubationsgefäße mit 2 ml eiskalter 0,9%iger NaCl-
Lösung. Zufügen der Spülflüssigkeit zu dem Inhalt der Zentri-
fugenröhrchen. Zentrifugieren in der Kälte für 10 Minuten bei
3000 U/min.

Milchsäurebestimmung

Die Bestimmung erfolgte im Überstand der incubierten Zellsuspension.

Testansatz: 0,2 ml Überstand (außer bei Glucose-überschuß; dort 0,1 ml)
 0,2 ml NAD-Lösung
 2,0 ml Glycinpuffer (pH:9,0), dem vorher die benötigte Menge Lactatdehydrogenase (LDH) zugefügt wurde.

Nach Zufügen des Glycinpuffer-LDH-Gemisches Einbringen der Reaktionsgefäße in ein Wasserbad bei 25°C für 1 Stunde. Danach Messung der Extinktion bei 334 nm in reduzierten 10 mm Küvetten im Eppendorf-Photometer gegenüber Luft. Nach Abzug eines Reagenzienleerwertes vom Meßwert, erhält man die durch den Lactatgehalt hervorgerufene Extinktionsänderung delta E.

zu Abb. 2

Nr.	delta E	Mittelwert n. Abzug d. Leerw.	Milchs. -Gehalt (mmol/g Zellen)
Leerwert	0,197 0,190	0,194	
0	0,347 0,343	0,151	42,42
1	0,224 0,234	0,035	10,08
2	1,440 1,480	1,266	737,30
3	0,376 0,389	0,189	55,68
4	0,295 0,288	0,098	29,60
5	0,277 0,230	0,060	17,52

Gesamtnucleotidbestimmung

Aufschließen der abzentrifugierten Zellen mit 2 ml eiskalter 0,5 n HClO_4 und Schütteln für 10 Minuten. Zentrifugieren in der Kälte. Bestimmung der Gesamtnucleotide aus dem Überstand.

Testansatz: 0,5 ml Überstand
 2,0 ml Aqua dest.

Messung der Extinktion in 10 mm Küvetten im Spektralphotometer bei 260 nm und 240 nm gegen Wasser.

Nr.	Extinktion bei		Mittelwert bei 260 nm	% - Gehalt 0-Wert = 100 %
	240 nm	260 nm		
0	0,282	0,454	0,454	100,0
	0,282	0,453		
1	0,254	0,435	0,434	95,6
	0,251	0,432		
2	0,298	0,553	0,560	123,5
	0,302	0,567		
3	0,339	0,644	0,640	141,0
	0,329	0,636		
4	0,334	0,642	0,641	142,0
	0,332	0,640		
5	0,327	0,612	0,614	135,4
	0,326	0,616		

Bestimmung von Zwischenprodukten des EMBDEN-MEYERHOF-Weges

(zu Tab. 1)

Die experimentellen Bedingungen (Zellkonzentration, Substratkonzentrationen, Aufarbeitung der Ansätze bis zur Gewinnung der Zellen) sind die gleichen wie in den auf Seite I der Belegprotokolle geschilderten Versuche. Die Wirkung von 0,1%iger delta Glucoselösung wurde hier nicht untersucht.

Zusätzlich wurden die Ansätze Nr. 2, 4 und 5 ohne Glutaminzusatz incubiert.

Die Incubationszeit war auf eine Stunde verkürzt.

Aufschließen der Zellen mit 2 ml eiskalter 0,3 n Trichloressigsäure. Schütteln für 10 Minuten. Entfernen der Trichloressigsäure durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther. Nach der letzten Ätherextraktion Abzentrifugieren des unlöslichen Rückstandes. Der klare Überstand wird abgetrennt und sein Volumen bestimmt.

G-6-P - Bestimmung

Testansatz:	1,0 ml Triäthanolaminpuffer
	0,04 ml NADPH-Lösung
	0,01 ml $MgCl_2$ -Lösung
	0,5 ml Überstand

Messung der Extinktion E_1 bei 366 nm in 10 mm Küvetten. Zumischen von 0,01 ml G-6-P-DH-Lösung.

Nach Reaktionsstillstand Ablesen von E_2 .

Aus der Extinktionsdifferenz $E_2 - E_1$ läßt sich der Gehalt an G-6-P berechnen.

Bestimmung von FDP und der Summe von DAP und GAP

Testansatz:	1,0 ml Triäthanolaminpuffer
	0,5 ml Überstand
	0,02 ml NADH-Lösung

Ablesen von E_1 bei 366 nm in 10 mm Küvetten.

Zumischen von 0,01 ml Glycerophosphat-Dehydrogenase-Triosephosphat-Isomerase-Gemisch

Ablesen von E_2 nach Reaktionsstillstand.

Zumischen von 0,01 ml Aldolase.

Ablesen von E_3 nach Reaktionsstillstand.

Aus der Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2$ läßt sich der Gehalt an DAP und GAP berechnen, aus $E_2 - E_3$ erhält man den Gehalt an FDP.

Nr.	1	2
Zusätze	250 μ g Glutamin in 0,1 ml 0,02 ml Glucose 5,54%ig 2 x 0,05 ml Tris-Puffer	wie "1" aber ohne Glutamin
Incubations- dauer	1 Stunde	1 Stunde
delta E	0,035	0,030
G-6-P	0,038	0,031
Gehalt in μ mol/g Zellen (Mittelwert)	1,08	0,90
delta E	0,049	0,045
DAP + GAP	0,033	0,042
Gehalt in μ mol/g Zellen (Mittelwert)	1,19	1,28
delta E	0,288	0,277
FDP	0,323	0,268
Gehalt in μ mol/g Zellen (Mittelwert)	4,48	3,96

Alle übrigen Ansätze zeigten eine Extinktionsdifferenz, die unter 0,010 lag.

PRPP-Bestimmung

(zu Abb. 6)

Beenden der Incubation durch Überführen des gesamten Ansatzes in Zentrifugengläser, die in kochendem Wasser stehen. Nach 30 sec. Abkühlen im Eisbad. Zentrifugieren. PRPP wird im Überstand bestimmt.

Testansatz: 1,0 ml Überstand
 0,05 ml Adeninlösung (102,5 nmol Adenin H³
 mit 2,5 μ Ci)
 0,10 ml Fermentzubereitung
 (s.S. 6)

Einbringen der Reaktionsgefäße in ein Wasserbad von 37°C. Beenden der Reaktion nach 60 min. durch Zugabe von 0,10 ml eiskalter 0,2 m HClO₄ und anschließendes Abkühlen im Eisbad. Durch Erhitzen der Reaktionsgefäße in kochendem Wasser für 3 Minuten wird weiteres Eiweiß ausgefällt. Zentrifugieren. 10 μ l des so gewonnenen Überstandes werden zusammen mit 10 μ g Träger-AMP auf 0,4 x 20,0 cm messende Chromatographie - papierstreifen aufgetragen. Aufsteigende Chromatographie in 1%iger Na₂HPO₄-Lösung. Lokalisieren der AMP-Flecke im UV-Licht. Ausschneiden dieser Bezirke. Elution des AMP durch dreimaliges Behandeln mit je 1,0 ml n/100 HCl. Überführen des Eluates in Szintillationsmeßgläser. Eintrocknen im Vacuum. Auflösen des Rückstandes mit 0,5 ml Aqua dest. und Zufügen von 5,0 ml wassermischbarer Szintillationslösung (Dioxan, 2,5-Diphenyloxazol, 1,4-bis-2-(5-Phenylloxazolyl)-Benzol, Naphthalin). Szintillationsmessung.

6 Tage alte Zellen; 50 mg Zellen/5 ml Incubationslösung
 Incubationsdauer 1 Stunde (Nr. 1 - 4), 5 Minuten (Nr. 0).
 Wasserwert + Reagenzienleerwert: 95,0 Imp/Min.

Nr.	Zusätze	AMP(Imp/min)	Mittelwert	Gehalt an PRPP μ mol/g Zellen
0	-	49,0 41,9	45,5	0,033
1	-	59,0 73,8	66,4	0,049
2	0,2 ml Glucoselsg. 5,54%ig + 2x 0,05 ml Tris-Puffer	672,0 674,0	673,0	0,491
3	0,2 ml Galactose- lsg. 5,54%ig	550,9 578,3	564,6	0,412
4	0,05 ml Glucose- lsg. 0,07%ig; alle 20 Minuten	414,3 383,9	399,1	0,291

(AMP-Impulsrate nach Abzug von Wasser- und Reagenzienleerwert)
 Standard-Messung: 0,1 nmol Adenin mit 25 nCi = 17550 Imp/Min.

LEBENS LAUF

Am 26.8.1942 wurde ich, Peter Alken, als Sohn des
Arztes Carl Erich Alken und der Frau Emma Werth
in Berlin geboren.

Ich besuchte dort die Grundschule, später in der
Oberstufe die Erich-Hoepner-Schule in Berlin-
Charlottenburg, wo ich am 26.2.1962 die Reife-
prüfung ablegte.

Im Sommersemester 1962 wurde ich an der Freien
Universität Berlin für das Studienfach Humanme-
dizin immatrikuliert. Hier bestand ich im Früh-
jahr 1963 das Vorphysikum und im Herbst 1964 das
Physikum. Am 25.3.1968 legte ich an der Freien
Universität Berlin das Medizinische Staats-
examen ab.

Im Sommer 1969 beendete ich ein neben dem Medi-
zinstudium begonnenes Studium der Chemie zunächst
mit dem Vordiplom an der Freien Universität Berlin.

Meine Pflichtfächer als Medizinalassistent ab-
solvierete ich am Klinikum Steglitz der Freien Uni-
versität Berlin.

Seit dem 1.2.1970 bin ich als Assistenzarzt an
der Chirurgischen Klinik des Krankenhaus Nordwest
in Frankfurt beschäftigt.

